

論文審査の結果の要旨

氏名：長 井 幸 一

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：唾液腺の腺房再生過程における EGF family の発現と役割

審査委員：(主査) 教授 大木 秀 郎

(副査) 教授 小宮山 一 雄

教授 高橋 富 久

教授 米原 啓 之

外分泌腺の一つである唾液腺は消化酵素の分泌、口腔内環境の維持など多様で重要な機能を担っている。加齢、唾石および癌の放射線治療などにより唾液腺は消失する。その結果、唾液腺の機能低下は唾液分泌量を減少させ、口腔の感染防御や生理機能の維持に重大な障害を引き起こす。したがって唾液腺の再生はQOL向上のためにも重要である。ラットの唾液腺排泄主導管を結紮すると唾液腺実質の萎縮が引き起こされる。しかし、結紮を解除することにより、唾液腺組織が正常唾液腺と同様の組織像を呈するまで回復する。この唾液腺主導管結紮と解除のモデルは、唾液腺の組織再生の過程を解明するために有用であると考えられるが、腺房細胞の再生メカニズムの詳細は未だ明らかにされていない。

著者は新たに開発した、血管クリップを用いる唾液腺再生マウスモデルを用いて腺房細胞を観察し、再生に関する直接的な機能的分子を検討した。

実験には、C57BL マウス雌 65 匹を実験に供した。腹腔内麻酔下にて左顎下部に切開を加え、顎下腺の主導管の基部にクリップを装着して結紮し、1週間後にクリップの解除を行った。その後、0, 1, 3, 7, および14日後にそれぞれの顎下腺を摘出して epidermal growth factor (EGF) family および EGF receptor (EGFR) の発現動態を経時的に免疫組織化学、Western blot および real time PCR で観察した。

また、唾液腺から導管上皮細胞を分離培養し、EGF family の一つである epiregulin 添加による細胞増殖能および EGF family の autocrine および juxtacrine 作用についても検索を行った。さらに再生唾液腺の機能を検討する目的で、腺房細胞の水分分泌機能に関与する aquaporin5 の発現について検索を行った。

マウス顎下腺の主導管を1週間結紮すると顎下腺は萎縮し、その重量は約40%減少するが、結紮解除によって処置前の約80%まで回復した。この変化を組織学的に観察すると、小葉内の腺房細胞はほぼ消失し、小葉内導管は立方型細胞からなる tubular structure に置き換わっていた。しかし、結紮を解除すると腺房細胞の再生が起こり正常唾液腺の小葉構造に回復していた。分裂期の細胞を検出する PCNA の免疫染色で、tubular structure を構成する細胞に多数の陽性細胞が認められ、陽性細胞数は結紮解除後3日まで有意に増加し、その後大きく減少した。このことから PCNA 陽性細胞がその後再生する腺房細胞の前駆細胞であると考えた。また、同時期に tubular structure で EGFR の発現が上昇した。このことから、結紮解除0日から3日目までが腺房細胞の再生に重要な期間であると考えた。著者はすでに、この唾液腺腺房細胞再生モデルを用いて、再生過程で発現する遺伝子変化を microarray 解析により腺房細胞の再生期には EGFR 発現増加がおこることを確認し、本実験においても免疫組織化学によって EGFR 発現増加を検出した。この EGFR にリガンドが結合して活性化が起きていることを EGFR のリン酸化の状態を免疫組織化学および Western blot で確認したところ、結紮解除後0日および1日目高度なリン酸化が起こり、その後は急速に減少した。これらの結果、腺房細胞の再生のシグナル伝達が結紮解除後の極めて短期間にかつ限定的に起こることを明らかにした。次に EGFR のリガンドとなる EGF family について遺伝子レベルの発現を検討した。その結果、EGFR のリン酸化に対応して発現増加するリガンドは、EGF family のうち epiregulin であることを見いだした。

さらに、epiregulin の唾液腺上皮細胞への増殖効果を検討するために、主導管を結紮して萎縮した顎下腺から酵素処理によって上皮細胞を分離した。この細胞の EGFR 発現を確認したのち epiregulin を作用させたところ、濃度依存的に増殖を示した。さらに、epiregulin を作用させた顎下腺上皮細胞は、betacellulin 以外の EGF family 遺伝子の発現を増加させたことから、epiregulin は autocrine および juxtacrine 作用を持つと考えられた。本モデルにおける再生腺房細胞の機能の回復について aquaporin 5 の発現を観察したところ、結紮による萎縮唾液腺では aquaporin 5 の発現の著しい低下

を認めたが、腺房細胞の再生と共に発現の増加をみたことから、唾液腺の分泌機能も回復すると考えられた。

以上、本研究の結果、マウス顎下腺腺房細胞再生において、EGF family の epiregulin は、EGFR を介して再生に関与する直接的な作用分子の一つであることを初めて明らかにした。

よって本論文は、博士（歯学）の学位を授与されるに値するものと認められる。

以 上

平成26年11月27日